

Medizinische
Habilitationsschrift
Erlangen

1956 № 28

Beobachtungen bei der Säurehydrolyse des Galaktogens

II. Mittel.: Isolierung und Nachweis der auftretenden Disaccharide

3β -D-Galaktosido-D-galaktose und 6β -D-Galaktosido-D-galaktose mit Spuren 6α -L-Galaktosido-D-galaktose

Von

H. Weinland

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. F. May)

(Der Schriftleitung zugegangen am 29. März 1956)

Die Spaltung von Galaktogen mit Mineralsäure verläuft bei schwachen Säurekonzentrationen so langsam, daß Zwischenprodukte gefaßt werden können. Namentlich zwei Spaltstücke, von mir Frakt. 3 und 4 benannt, die sich bei papierchromatographischer Aufteilung gut abtrennen (vgl. Abb. 1) werden in jedem Stadium der Hydrolyse auf den Chromatogrammen beobachtet. Anfangs tritt eine zunehmende Verstärkung dieser Ablagerungen auf und nach Überschreiten eines Maximums wird die abgelagerte Menge wieder geringer bei gleichzeitigem Verschwinden der höhermolekularen Produkte am Start. In diesen Fraktionen müssen somit Bindungen vorhanden sein, die im Galaktogen besonders häufig vorkommen.

Zur Gewinnung größerer Mengen dieser Fraktionen wurde Galaktogen als 3-proz. Lösung mit $n/10$ - H_2SO_4 12 Stdn. hydrolysiert. Hier war die größte Ausbeute zu erwarten¹. Die Isolierung erfolgte papierchromatographisch, die Reinigung durch insgesamt 3-malige Wiederholung, wodurch reine, einheitliche Fraktionen erhalten wurden. Sie wandern bei Anwendung von Elektrophorese in die elektroneutrale Zone und liefern keine anderweitigen Ablagerungen auf dem Elektropherogramm. Eine elektrophoretische Nachreinigung ist also hier nicht notwendig, dagegen wurde das aus der Darstellung mit Butanol-Eisessig-Wasser stammende Acetat mit Ionenaustauschern entfernt.

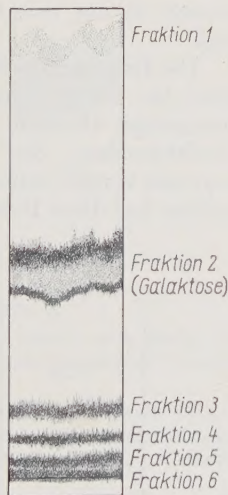


Abb. 1. 3-proz. Galaktogenlösung, 12 Stdn. mit $n/10$ - H_2SO_4 gespalten.

Die einzelnen aus dem Hydrolysegemisch sich abtrennenden Fraktionen.

¹ Vgl. I. Mittel.: F. May u. H. Weinland, diese Z. 305, 75 [1956], vorstehend.

Die Tab. 1 zeigt zunächst, daß es sich um zwei Disaccharide handelt. Hier wurde die Reduktion vor und nach Spaltung der Analysenlösungen mit *n*-HCl bestimmt nach verschiedenen Methoden^{2,3}.

Tab. 1. Reduktion der Fraktionen 3 und 4 in g% vor und nach Invertierung.

	3	4
Nach Trockengewicht, aschefrei	0,79	0,70
Nach Macleod-Robison ² , Lösg. nicht invertiert, als Galaktose	0,38	0,34
Nach Hagedorn-Jensen ³ , Lösg. nicht invertiert als Galaktose	0,39	0,32
Nach Macleod-Robison, Lösg. invertiert	0,68	0,63
Nach Hagedorn-Jensen, Lösg. invertiert	0,59	0,58

Aus Aldehydgruppenbestimmung und Trockengewicht errechnet sich für Frakt. 3 ein Mol.-Gewicht von 377, für Frakt. 4 von 374 (Mol.-Gew. für ein Galaktose-disaccharid theoret. 342).

Beide Disaccharide sind in ihrem Auftreten begründet durch die Untersuchungen von Schlubach⁴ sowie Bell und Baldwin⁵ über den Bau des Galaktogens, in welchem sie nur 1—3- und 1—6-Bindungen im Verhältnis 1:1 feststellen und deshalb eine durchlaufende Kette annehmen, in der jede Galaktose eine weitere Galaktose als Seitenzweig trägt.

Die Bindung beider Disaccharide ist eine β -galaktosidische, da beide selbst bei 4-stdg. Gärung auf Papier von an D-Galaktose gewöhnter untergäriger Bierhefe nicht angegriffen werden. Diese Hefe besitzt eine α -Galaktosidase. Sie spaltet z. B. Melibiose (6 α -D-Galaktosido-D-glucose) und vergärt dann die entstandenen Monosaccharide. Eine β -Galaktosidase hat diese Hefe nicht, der Milchzucker bleibt unangegriffen⁶.

Tab. 2. Eigenschaften der beiden Disaccharide.

	[α] _D	Schmp. nach Kofler °C	Phenylsazon		Verh. geg. Hefe mit α -Galaktosidase	<i>R_F</i> -Wert, bez. auf Galaktose 0,16. Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5
			Schmp. nach Kofler °C	Krist.-Form		
Frakt. 3	+53,4° ± 0,9°	unscharf 119—128	194	Nadeln	nicht vergärbar	0,07
Frakt. 4	+34,2° ± 1,2°	114	187—189	Seeigel-formen	nicht vergärbar	0,04

² M. Macleod u. R. Robison, Biochem. J. **23**, 517 [1929].

³ P. A. Larsson u. S. L. Sveinsson, Skand. Arch. Physiol. **83**, 58 [1939] (eine für Galaktose abgewandelte Hagedorn-Jensen-Methode).

⁴ H. H. Schlubach u. W. Loop, Liebigs Ann. Chem. **532**, 228 [1937].

⁵ E. Baldwin u. J. O. Bell, J. chem. Soc. [London] **1938**, 1461.

⁶ H. Weinland u. F. May, diese Z. **293**, 153 [1953].

Die β -Bindung in beiden Disacchariden zeigt sich außerdem darin, daß ihre spezif. Drehungen relativ niedrig sind; vgl. Tab. 2, in der die wesentlichen Eigenschaften beider Fraktionen angegeben sind.

Bei Frakt. 4 handelt es sich offenbar um die von Freudenberg und Mitarbb.⁷ synthetisch dargestellte 6β -D-Galaktosido-D-galaktose mit $[\alpha]_D + 34,1^\circ$. Der Schmelzpunkt des Phenylsazons wird mit „207° unter Zersetzung“ angegeben.

Frakt. 3 stellt somit das andere im Galaktogen präformierte Disaccharid dar, das auf Grund aller vorliegenden Aussagen als 3β -D-Galaktosido-D-galaktose angesprochen werden muß*.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob eines dieser beiden Disaccharide L-Galaktose enthält. Diese konnte dann nur in dem Disaccharid auftreten, welches die seitlich gebundene Galaktose enthält⁹. Nach 12-stdg. Hydrolyse mit $n/10$ -H₂SO₄ ist allerdings in den Spaltstücken nicht mehr viel gebundene L-Galaktose zu erwarten¹.

In Frakt. 4 ließ sich nach Spaltung mit n -HCl L-Galaktose im Chromatogramm nachweisen, die nach Vergären der D-Galaktose mit der

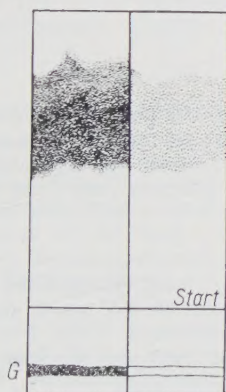


Abb. 2.

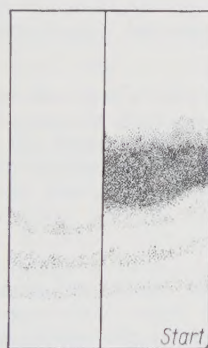


Abb. 3.

Abb. 2. Galaktose aus Frakt. 4, links direkt entwickelt, rechts nach 2stdg. Vergärung. G = Gärttest: 1-proz. D-Galaktose, aufgetragen nach beendeter Chromatographie.

Abb. 3. Galaktose aus Frakt. 3, links vergoren, rechts direkt entwickelt. Man erkennt die abgetrennten, im Gegensatz zur höher liegenden Galaktose nicht vergärbaren Hydrolysenrestprodukte.

* Wahrscheinlich hat Bourquelot⁸ die beiden Disaccharide schon in der Hand gehabt in seiner Galaktobiose A mit $[\alpha]_D = +35,0^\circ$ und Schmp. des Phenylsazons 194° und in seiner Galaktobiose B mit $[\alpha]_D = +53,1^\circ$, die beide β -galaktosidisch gebunden sind und bei monatelanger Einwirkung von Emulsin auf eine gesättigte Galaktoselösung entstanden waren.

⁷ K. Freudenberg, A. Wolf, E. Knopf u. S. H. Zaheer, Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 1735 u. 1743 [1928].

⁸ Ém. Bourquelot, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **163**, 60 [1916]; **164**, 443, 521 [1917].

⁹ J. O. Bell u. E. Baldwin, J. chem. Soc. [London] **1941**, 125.

oben genannten Bierhefe übrig blieb (vgl. Abb. 2). Frakt. 3 zeigt dagegen keinen unvergärbaren Galaktoserest (Abb. 3), enthält also keine L-Galaktose.

Die Frakt. 4 enthält also neben 6β -D-Galaktosido-D-galaktose noch Spuren 6α -L-Galaktosido-D-galaktose und ist somit als das Disaccharid mit der Seitenkettenbindung anzusprechen, wofür in einer der nächsten Mitteilungen noch weitere Beweise erbracht werden.

Die Spaltungsgeschwindigkeit in $n/10$ -HCl ist für beide Disaccharide dieselbe. Sie verschwinden bei papierchromatographischer Verfolgung der Hydrolyse aus gleich konzentrierten Lösungen praktisch zur selben Zeit.

Beschreibung der Versuche

Partielle Galaktogenhydrolyse: 90 ccm aus der in der I. Mitteil.¹ hergestellten Galaktogen-Ausgangslösung mit 5,94% Galaktogen (als aschefrei berechnet) wurden mit 90 ccm 0,2-n. H_2SO_4 versetzt und 12 Stdn. im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Danach war die Lösung schwach gelb und hatte einen kaum merklichen Geruch nach Karamel. Sie wurde nach Abkühlen mit etwa 2 g $BaCO_3$ neutralisiert, der abzentrifugierte Niederschlag einmal mit Wasser gewaschen und das Waschwasser mit der Lösung vereinigt, worauf sie im Meßkölbchen auf 200 ccm aufgefüllt wurde.

Untersuchung der Lösung

Optische Drehung im 10-cm-Rohr: $+1,31^\circ \pm 0,02^\circ$ (Mittel aus 10 Ablesungen).

Reduktion nach Fehling-Lehmann-Schoorl (Mittel aus mehreren Bestimmungen): 2 ccm = 12,37 ccm $n/10$ -Thiosulfat, entspr. 44,5 mg Galaktose. Bezogen auf Galaktosereduktion ist die Lösung somit 2,23-proz.; aus dieser Galaktosereduktion errechnet sich ein „Reduktions- $[\alpha]_D$ “ von $+58,7^\circ$, das in Übereinstimmung steht mit dem früher ermittelten von $+58,0^\circ$ für die entsprechende Hydrolysezeit¹.

Papierechromatographische Aufteilung: Nach Einengen der restlichen Lösung im Vak. bei 35° auf etwa 20 ccm (pH -Kontrolle 6,5) wurde die gesamte Lösung auf 50 Bogen Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043b auf der Startlinie möglichst gleichmäßig strichförmig aufgetragen und alle Bogen 96 Stdn. absteigend in Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 chromatographiert. Nach dem Trocknen wurden pro Bogen 10 Suchstreifen ausgeschnitten, mit Benzidin behandelt und mit ihrer Hilfe die Lage der einzelnen Fraktionen festgestellt.

Die Fraktionen 3 und 4 wurden einzeln ausgeschnitten, eluiert und auf kleines Volumen eingengt, entsprechend dem Vorgehen in der I. Mitteilung.

Reinigung der Fraktionen 3 und 4: Die erste papierchromatographische Nachreinigung erfolgte aus etwa 7-proz. aufgetragenen Lösungen unter denselben Bedingungen wie oben, wobei sich aus Frakt. 3 noch eine Spur Galaktose abtrennte, aus Frakt. 4 eine Spur der Frakt. 3. Die zweite papierchromatographische Nachreinigung, in gleicher Weise durchgeführt, ließ keine Auswanderung anderer Substanzen mehr erkennen.

Zur Entsalzung wurden beide Fraktionen in 5 ccm Wasser aufgenommen und, wie früher beschrieben, mit Lewatit KS und M 1 behandelt, worauf beide Lösungen zusammen mit den zugehörigen Waschwassern im Vak. eingengt bzw. zur Trockne gebracht wurden.

Untersuchung der Frakt. 3

Die farblose trockene Substanz, in etwa 1 ccm Wasser gelöst, wurde quantitativ in ein 5-ccm-Meßkölbchen überführt und dieses zur Marke aufgefüllt (Ausgangslösung).

Die Lösung diente:

1. für die Bestimmung der optischen Drehung,
2. für Invertierungen,
3. nach bestimmten Verdünnungen zu weiteren Analysen an der nicht invertierten Substanz.

ad 1

Opt. Drehung der Ausgangslösung im 20-cm-Halbmikrorohr: $+0,773^{\circ} \pm 0,006^{\circ}$
(Mittelwert aus 10 Ablesungen).

ad 2

Je 1 ccm der Ausgangslösung werden in 2 Meßkölbchen mit 1,5 ccm Inhalt im Vak. bei Zimmertemperatur zur Trockne eingengt und dann mit 0,75 ccm *n*-HCl versetzt, 2 Stdn. im kochenden Wasserbad invertiert, anschließend mit 2-n. NaOH neutralisiert und zur Marke aufgefüllt.

Die invertierte Lösung diente:

- a) für die Bestimmung der optischen Drehung,
- b) für die Bestimmung des Reduktionswertes nach Macleod-Robison (Aldehydgruppenbestimmung),
- c) für die Bestimmung des Reduktionswertes nach Hagedorn-Jensen³,
- d) für Papierchromatographie.

ad a): Opt. Drehung der invertierten Lösung im 10-cm-Halbmikrorohr:

Kölbchen 1: $+0,29^{\circ} \pm 0,009^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen)

Kölbchen 2: $+0,31^{\circ} \pm 0,005^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen)

Mittel: $+0,30^{\circ} \pm 0,007^{\circ}$

Nun Verdünnung der beiden invertierten Lösungen für Analyse b) und c): 0,75 ccm wurden im 5-cm-Meßkölbchen zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:6,67). Mit diesen Lösungen wurde die Bestimmung nach Macleod-Robison zur Ermittlung der Aldehydgruppen unmittelbar ausgeführt, für die Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen wurden diese Lösungen weiter verdünnt.

ad b): Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison (Mittel aus mehreren Bestimmungen):

Kölbchen 1: 1 ccm = $1,50 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 675 γ Galaktose bzw. 0,00375 mMol Zucker

Kölbchen 2: 1 ccm = $1,50 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat; somit dieselben Werte wie oben.

ad c): Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode): Je 1 ccm der oben für Macleod-Robison 1:6,67 verdünnten invertierten Lösungen wurden im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1:66,7.

(Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.)

Kölbchen 1: 2 ccm = $1,51 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 114 γ Galaktose

1 ccm = $1,75 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 58 γ Galaktose

Kölbchen 2: 2 ccm = $1,49 \pm 0,00$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 119 γ Galaktose

1 ccm = $1,74 \pm 0,03$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 60 γ Galaktose

Mittel für 1 ccm ausgedrückt in Galaktose = $58,5 \gamma \pm 1 \gamma$.

ad 3

2 ccm der Ausgangslösung im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt (Verdünnung 1:5).

Diese Lösung wurde verwendet:

- a) zur Bestimmung von Trockengewicht, Zersetzungstemperatur und Asche,
- b) zur Bestimmung der Aldehydgruppen vor Invertierung (Macleod-Robison),
- c) zur Bestimmung der Reduktion vor Invertierung nach Hagedorn-Jensen.

ad a) Trockengewicht und Zersetzungstemperatur:

Je 2 ccm der 1:5 verdünnten Ausgangslösung wurden in 2 Platintiegeln bei 10 Torr und 40° zur Trockne eingedampft und anschließend bei 85°, 110° und 120° je 24 Stdn. getrocknet. Abb. 4 zeigt den Zersetzungspunkt an der Stelle, wo die Trockenkurve durch Zersetzung der Substanz plötzlich stark abfällt¹⁰, im vorliegenden Falle bei 100°–105°.

Trockengewicht samt Asche in obigen 2 ccm = 3250 γ .

Aschegehalt:

Die Substanz wurde vorsichtig bei kleiner Flamme verascht und ergab:

Tiegel 1: 0,095 mg

Tiegel 2: 0,109 mg

Mittel: 0,102 $\pm$ 0,007 mg Asche in 3,250 mg Substanz = 3,1% Asche.

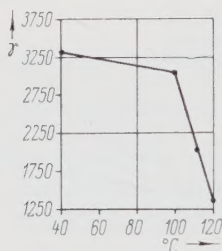


Abb. 4. Trockengewicht und Zersetzungstemperatur der Frakt. 3.

ad b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison in der nicht invertierten Lösung:

Analyse der 1:5 verdünnten Ausgangslösung (Mittelwert aus mehreren Bestimmungen):

1 ccm = 1,67 $\pm$ 0,02 ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 751 γ Galaktose
bzw. 0,00417 mMol Zucker.

ad c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode) in der nicht invertierten Lösung:

1 ccm der 1:5 verdünnten Ausgangslösung wurde im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt: nun Verdünnung 1:50.

(Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.)

2 ccm = 1,34 $\pm$ 0,01 ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 154 γ Galaktose

1 ccm = 1,66 $\pm$ 0,03 ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 78 γ Galaktose

Mittel für 1 ccm, ausgedrückt in Galaktose = 77,3 $\gamma \pm$ 0,3 γ

Die Auswertung der Analysen ergab, bezogen auf die Ausgangslösung, die in Tab. 1, S. 88 enthaltenen Konzentrationsverhältnisse.

Für die spezif. Drehung des Disaccharides Frakt. 3 errechnet sich:

Aus der Konzentration nach Trockengewicht aschefrei $[\alpha]_D = +49,2^0$ (*c* = 0,79)

Aus Aldehydgruppenbestimmung unter Einsetzen eines

Disaccharides aus Galaktose $[\alpha]_D = +54,1^0$ (*c* = 0,71)

bzw. aus weiteren Analysen nach dieser Bestimmungs-

art an einer nicht über Lewatit gereinigten Lösung $[\alpha]_D = +52,4^0$ (*c* = 15,2)

$[\alpha]_D = +53,8^0$ (*c* = 2,3)

Als Mittelwert ergibt sich unter Weglassung des Wertes aus Trockengewichtsbestimmungen, der deutlich abweicht, ein $[\alpha]_D = +53,4^0 \pm 0,9^0$.

¹⁰ F. May u. L. Stadelmann, Z. Biol. 99, 462 [1939].

Für die spezif. Drehung der invertierten Lösung errechnet sich:

- a) nach Robison-Macleod (2b) $[\alpha]_D = +66,7^{\circ}$ ($c = 0,45$)
 b) nach Hagedorn-Jensen (2c) $[\alpha]_D = +76,7^{\circ}$ ($c = 0,39$)

Beide Werte erreichen die spezif. Drehung der reinen D-Galaktose von $+80^{\circ}$ nicht und könnten somit auf einen Gehalt an L-Galaktose hindeuten. Erst die papierchromatographische Untersuchung der Lösung (Abb. 3) zeigte, daß die zu niedrig gefundene spezif. Drehung nicht durch L-Galaktose bedingt ist, sondern durch ungespaltene Restsubstanzen.

Phenyllosazon: Etwa 7 mg der Frakt. 3 wurden im Mikroreagenzglas in 0,1 ccm Wasser gelöst und mit 0,05 ccm frisch dest. Phenylhydrazinbase und 0,25 ccm 2-n. Essigsäure versetzt. Das Gemisch wurde 1 Stde. im kochenden Wasserbad gehalten, wobei die Lösung völlig klar blieb und die bekannte gelbe Farbe der Osazone annahm. Dann wurde die Lösung bei 5° aufbewahrt.

Nach 2 Wochen erfolgte die Kristallisation eines hellgelben, aus sehr feinen Nadelchen bestehenden Osazons, das zur Schmp.-Bestimmung mehrmals mit Aceton und kaltem Wasser gewaschen und im Vak. bei Zimmertemperatur getrocknet wurde.

Der Schmp., bestimmt mit Thermomikroskop nach Kofler, liegt bei 194° ; bei 196° wird die hellgelbe Schmelze braun.

Untersuchung der Frakt. 4

Frakt. 4 (6 β -D-Galaktosido-D-galaktose mit Spuren 6 α -L-Galaktosido-D-galaktose)

Die farblose trockene Substanz, in etwa 1 ccm Wasser gelöst, wurde quantitativ in ein 1,5-cm-Meßkölbchen überführt und dieses zur Marke aufgefüllt (Ausgangslösung).

Die Lösung diente:

- I. für die Bestimmung der optischen Drehung,
- II. nach bestimmter Verdünnung zu weiteren Analysen.

ad I:

Opt. Drehung der Ausgangslösung im 10-cm-Halbmikrorohr: $+1,51^{\circ} \pm 0,006^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen).

ad II:

Die gesamte Ausgangslösung wurde im 10-cm-Meßkölbchen quantitativ gesammelt und zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1 : 6,67).

Diese Lösung wurde verwendet:

1. für die erneute Bestimmung der optischen Drehung,
2. für Invertierungen,
3. nach bestimmten Verdünnungen zu weiteren Analysen an der nicht invertierten Substanz.

ad 1: Opt. Drehung der 1 : 6,67 verdünnten Ausgangslösung im 10-cm-Halbmikrorohr: $+0,23^{\circ} \pm 0,000^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen).

ad 2:

α) 1 ccm der 1 : 6,67 verdünnten Ausgangslösung im Meßkölbchen mit 1,5 ccm Inhalt wurde im Vak. bei 10 Torr und Zimmertemperatur zur Trockne gedampft und dann mit 0,75 ccm $n/10$ -HCl versetzt. Die Lösung diente zur papierchromatographischen Verfolgung der Hydrolyse im kochenden Wasserbad während 9 Stdn., s. S. 96.

β) Je 1 ccm der 1 : 6,67 verdünnten Ausgangslösung in 2 Meßkölbchen mit 1,5 ccm Inhalt wie oben zur Trockne eingedampft und dann mit 0,75 ccm n -HCl versetzt, 2½ bzw. 5 Stdn. im kochenden Wasserbad invertiert, anschließend mit 2-n. NaOH neutralisiert und zur Marke aufgefüllt.

Die invertierten Lösungen dienen:

- a) für die Bestimmung der optischen Drehung,
- b) für die Aldehydgruppenbestimmung nach Robison-Macleod,
- c) für die Bestimmung des Reduktionswertes nach Hagedorn-Jensen³,
- d) für Papierchromatographie.

ad a) Opt. Drehung der invertierten Lösungen im 10-cm-Halbmikrorohr:

2½ Stdn.: $+0,33^{\circ} \pm 0,01^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen)

5 Stdn.: $+0,25^{\circ} \pm 0,01^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen)

Nun Verdünnung der beiden invertierten Lösungen für Analyse b) und c): Beide Lösungen wurden je quantitativ in einem 5-cm-Meßkölbchen gesammelt und zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:33,3). Mit diesen Lösungen wurde die Bestimmung nach Macleod-Robison zur Ermittlung der Aldehydgruppen unmittelbar ausgeführt. Für die Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen wurden die Lösungen weiter verdünnt.

ad b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison (Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen):

2½ Stdn.: 1 ccm = $2,84 \pm 0,03$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 1278 γ Galaktose bzw. 0,0071 mMol Zucker

5 Stdn.: 1 ccm = $2,77 \pm 0,03$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 1247 γ Galaktose bzw. 0,0069 mMol Zucker

Mittel für 1 ccm, ausgedrückt in Galaktose = $1263 \gamma \pm 15 \gamma$

ad c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode): Je 1 ccm der oben für Macleod-Robison 1:33,3 verdünnten, invertierten Lösungen wurde im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1:333. (Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.)

2½ Stdn.: 2 ccm = $1,00 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 235 γ Galaktose

1 ccm = $1,51 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 115 γ Galaktose

5 Stdn.: 2 ccm = $1,03 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 228 γ Galaktose

1 ccm = $1,54 \pm 0,01$ ccm *n*/200-Thiosulfat, entspr. 108 γ Galaktose

Mittel für 1 ccm, ausgedrückt in Galaktose = $115 \gamma \pm 2 \gamma$

ad d) Die restliche invertierte Lösung aus 2b wurde nach Einengen zu papierchromatographischen Untersuchungen verwendet.

ad 3: 3 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung wurden im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt (Verdünnung 1:22,2).

Die Lösung wurde verwendet:

- a) zur Bestimmung von Trockengewicht, Zersetzungstemperatur und Asche,
- b) zur Bestimmung der Aldehydgruppen vor Invertierung (Macleod-Robison),
- c) zur Bestimmung der Reduktion vor Invertierung nach Hagedorn-Jensen.

ad a) Trockengewicht und Zersetzungstemperatur:

Je 2 ccm der 1:22,2 verdünnten Ausgangslösung wurden in 2 Platintiegeln bei 10 Torr und 40° zur Trockne gedampft und anschließend bei steigender Temperatur die Gewichtsabnahme verfolgt (vgl. Abb. 5).

Der Zersetzungspunkt der Substanz ergibt sich danach zu 105°.

Trockengewicht samt Asche in obigen 2 ccm = 4340 γ .

Aschegehalt: Die Substanz wurde vorsichtig bei kleiner Flamme verascht und ergab:

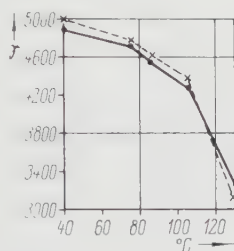
Tiegel 1: 0,164 mg

Tiegel 2: 0,146 mg

Mittel: 0,155 mg Asche in 4,340 mg Substanz = 3,6% Asche.

ad b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison in der nicht invertierten Lösung:

Abb. 5. Trockengewicht und Zersetzungstemperatur der Frakt. 4.



(Analyse der 1 : 22,2 verdünnten Ausgangslösung.)

(Mittelwert aus mehreren Bestimmungen.)

1 ccm = $2,25 \pm 0,02$ n/200-Thiosulfat, entspr. 1013 γ Galaktose
bzw. 0,0056 mMol Zucker.

ad c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode) in der nicht invertierten Lösung.

1 ccm der 1 : 22,2 verdünnten Ausgangslösung wurde im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1 : 222.

(Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.)

2 ccm = $1,16 \pm 0,00$ ccm n/200-Thiosulfat, entspr. 196 γ Galaktose

1 ccm = $1,59 \pm 0,01$ ccm n/200-Thiosulfat, entspr. 95 γ Galaktose

Mittel für 1 ccm, ausgedrückt in Galaktose = $97 \gamma \pm 1 \gamma$

Die Auswertung der Analysen ergibt, bezogen auf die Ausgangslösung der Frakt. 4, die in Tab. 1, S. 88, enthaltenen Konzentrationsverhältnisse.

Für die spezif. Drehung des Disaccharides Frakt. 4 errechnet sich

aus der Konzentration nach Trockengewicht aschefrei $[\alpha]_D = +32,1^0$ ($c = 4,7$)
 $[\alpha]_D = +32,9^0$ ($c = 0,7$)

aus Aldehydgruppenbestimmung unter Einsetzen eines
Disaccharides aus Galaktose $[\alpha]_D = +35,3^0$ ($c = 4,3$)
 $[\alpha]_D = +35,8^0$ ($c = 0,64$)

Als Mittelwert aus allen Bestimmungen ergibt sich ein $[\alpha]_D = +34,2^0 \pm 1,3^0$

Für die spezif. Drehung der invertierten Lösungen errechnet sich:

bei 2½ Stdn. Invertierung:

nach Macleod-Robison aus 2a und 2b $[\alpha]_D = +78,0^0$ ($c = 0,43$)

nach Hagedorn-Jensen aus 2a und 2c $[\alpha]_D = +84,0^0$ ($c = 0,39$)

bei 5stdg. Invertierung:

nach Macleod-Robison aus 2a und 2b $[\alpha]_D = +59,5^0$ ($c = 0,42$)

nach Hagedorn-Jensen aus 2a und 2c $[\alpha]_D = +67,5^0$ ($c = 0,37$)

Die Werte nach 2½stdg. Invertierung entsprechen der spezif. Drehung reiner D-Galaktose. Die papierchromatographische Prüfung ergibt jedoch, daß Spuren von L-Galaktose gleichzeitig vorhanden sind; vgl. Abb. 2.

$[\alpha]_D$ nach 5stdg. Spaltung weicht stark ab, viel stärker als dem papierchromatographisch ermittelten L-Galaktosegehalt entspricht. Hier spielt die übermäßig lange Invertierung mit n-HCl eine Rolle. Diese bedingt immer Begleitreaktionen der Zucker unter Braunfärbung.

Phenylosazon: Darstellung aus 5 mg Substanz, die übrigen Mengenverhältnisse wie bei Frakt. 3. Das Gemisch wurde 30 Min. im kochenden Wasserbad belassen und die klare gelbe Lösung anschließend bei 5° aufbewahrt. Nach 14 Stdn. kristallisierte bereits ein hellgelbes Osazon; die Kristalle ähneln den Seiegelformen des Milchzuckerosazons.

Die sehr kleinen Osazonmengen wurden für die Schmp.-Bestimmung mehrmals mit Aceton und anschließend mit kaltem Wasser gewaschen und im Vak. bei Zimmertemperatur getrocknet. Der Schmp. im Thermomikroskop nach Kofler liegt bei 187–189°. Bei 204° ist die Masse tief braun.

Die Spaltungsgeschwindigkeit

3 β -D-Galaktosido-D-galaktose: 0,75 ccm einer 1,11-proz. Lösung in *n*/10-HCl im kochenden Wasserbad hydrolysiert, zeigen bei stündlicher papierchromatographischer Untersuchung von je 10 cmm, daß noch nach 9 Stdn. eine Spur des Disaccharides vorhanden ist.

6 β -D-Galaktosido-D-galaktose: 0,75 ccm einer 0,77-proz. Lösung in *n*/10-HCl zeigen bei gleicher Behandlung, daß die letzte Spur des Disaccharides zwischen der 6. und 7. Stde. aus der Lösung verschwindet. Auf die Konzentration 1,11% umgerechnet, ergibt sich eine Spaltungszeit von 9,3 Stdn., also gleich wie für 3 β -D-Galaktosido-D-galaktose.

Zusammenfassung

Bei der Säurehydrolyse von Galaktogen treten zwei β -galaktosidisch gebundene Disaccharide auf. Ihre Eigenschaften (Schmelzpunkt, Osazonbildung, spezif. Drehung, Vergärbarkeit, Spaltungsgeschwindigkeit) werden nach Isolierung und Reinigung genauer untersucht und ihre Beteiligung am Galaktogenaufbau diskutiert.

Summary

In the acid hydrolysis of galactogen two disaccharides bound by β -galactoside linkages are formed. After isolation and purification their melting points, specific rotation and rate of cleavage were determined and their fermentability and osazone formation investigated. The role of the two components in the galactogen structure is discussed.

Beobachtungen bei der Säurehydrolyse des Galaktogens

IV. Mitteil.: Berechnung der spezif. Drehung des Galaktogens aus den Drehungsbeiträgen der verschieden gebundenen Galaktosen

Von

H. Weinland

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. F. May)

(Der Schriftleitung zugegangen am 3. Mai 1955)

In der III. Mitteilung¹ ließ sich die spezif. Drehung der entstandenen Tri- und Pentasaccharide erklären durch deren Aufbau aus D-Galaktosen mit β -1-3-gebundener Hauptkette und β -1-6-gebundenen Seitenzweigen. Für die Drehung längerer Moleküle gleicher Struktur kann man voraussetzen, daß die spezif. Drehung bei zunehmender Kettenlänge immer mehr abnimmt, weil der Anteil, den das hochdrehende aldehydische Ende des Moleküls an der Gesamtdrehung ausmacht, im Verhältnis immer kleiner wird und immer weniger ins Gewicht fällt. Für Moleküle mit maximaler Zahl an β -1-6-gebundenen D-Galaktose-Seitenzweigen würde die spezif. Drehung einem Endwert von $[\alpha]_D = + 3,1^\circ$ zustreben, diesen jedoch nie erreichen oder gar unterschreiten (vgl. Tab. 1); mit steigender Molekülgröße nimmt die spezif. Drehung zunehmend langsamer ab. Eine negative spezif. Drehung, wie sie im Galaktogen vorliegt, kommt offenbar erst durch den Einbau von L-Galaktosen in die Seitenzweige des Moleküls zustande.

Tab. 1. Berechnete $[\alpha]_D$ -Werte für Moleküle verschiedener Größe mit „galaktogenartiger Struktur“, aber L-frei.

Struktur (jeder senk- rechte Strich (n) bedeutet einen Galaktoserest)	D-Galaktosen pro Molekül	$[\alpha]_D$ er- rechnet
	8	+ 11,3°
	16	+ 7,4°
...29...	80	+ 4,1°
...389...	800	+ 3,3°
Sehr große Moleküle	∞	+ 3,1°

Die spezif. Drehung des Galaktogens kann nach dem obigen nur ausgewertet werden, wenn Anhaltspunkte für die Molekülgröße und für den Drehungsanteil der gebundenen L-Galaktose vorliegen. Zur Molekülgrößenbestimmung wurden Analysen über den Phosphorgehalt des Galaktogens herangezogen. Im Mittel bestimmt sich dieser zu 0,22% P;

¹ F. May u. H. Weinland, diese Z. 305, 207 [1956], vorstehend.

d. h. auf eine Phosphorsäure kommen etwa 80 Galaktosen (82—87), die man als die kleinste Einheit im Galaktogen annehmen kann.

Die in α -1-6-Bindung vorliegende L-Galaktose² ist für den Drehwert der bisher untersuchten Spaltstücke nicht zu berücksichtigen, da sie davon frei sind. Der Wert für den Drehungsbeitrag α -1-6-gebundener D-Galaktose findet sich in der Literatur mit + 39 000 angegeben³ und ist somit für α -1-6-gebundene L-Galaktose von gleicher Größe mit negativem Vorzeichen.

Das Verhältnis von D : L-Galaktose im Galaktogen konnten wir im Endstadium der Hydrolyse früher schon mit 7 : 1 ermitteln⁴; somit treffen auf die obige Einheit 10 L-Moleküle. Danach errechnet sich die spezif. Drehung des Galaktogens wie folgt:

1. Anfangsgalaktose mit freier Aldehydgruppe	+ 14 450
2. 39 in Hauptkette β -1-3-gebundene D-Galaktosen = 3810×39 . .	+ 148 590
ergibt für die gesamte Hauptkette	+ 163 040
3. 30 als Seitenzweige β -1-6-gebundene D-Galaktosen	- 2750 $\times$ 30 82 500
ergibt für das L-Galaktose-freie Molekül	+ 80 540
4. 10 als Seitenzweige β -1-6-gebundene L-Galaktosen = $- 39000 \times 10$. .	- 390 000
molekulare Drehung des Gesamtmoleküls	- 309 460

Unter Einsetzen des Molekulargewichts von $(80 \times 180) - (79 \times 18) = 12\,978$, ergibt sich hieraus ein $[\alpha]_D = -23,9^\circ$.

Tab. 2 zeigt in ihrer ersten Zeile, wie wenig sich der $[\alpha]_D$ -Wert des Galaktogens bei Annahme größerer Moleküle ändern würde. Der positive Drehungsanteil des aldehydischen Endes fällt hier bereits bei 80 Galaktosen im Molekül nicht mehr ins Gewicht. Die berechnete Drehung würde sich für das Verhältnis 7 D : 1 L-Galaktose nicht wesentlich ändern, gleichgültig das Wievielfache von 80 Galaktosen im Galaktogen enthalten ist.

Tab. 2. Berechnete $[\alpha]_D$ -Werte für Moleküle mit Galaktogenstruktur, L-haltig.

D:L-Verhältnis	$[\alpha]_D$ bei Anzahl Galaktosen pro Molekül		
	80	800	8000
7:1	-23,9°	-24,6°	-24,7°
9:1	-18,3°	-19,0°	-19,1°
11:1	-14,9°	-15,3°	-15,4°
	(84 Galaktosen)	(840 Galaktosen)	(8400 Galaktosen)

In Tab. 2 sind noch andere D : L-Verhältnisse aufgenommen. Man erkennt an diesen, daß ein D : L-Verhältnis von 6 : 1, wie es von Bell und Baldwin angenommen wurde⁵, eine wesentlich negativere spezif. Drehung fordert, als sie in ihren Messungen mit $[\alpha]_D = -16,1^{06}$ fanden.

² F. May u. H. Weinland, diese Z., **305**, 75 [1956].

³ D. French, *Advances Carbohydrate Chem.* **9**, 149 [1954].

⁴ F. May u. H. Weinland, diese Z. **296**, 154 [1954].

⁵ J. O. Bell u. E. Baldwin, *J. chem. Soc. [London]* **1941**, 125.

⁶ E. Baldwin u. J. O. Bell, *J. chem. Soc. [London]* **1938**, 1461.

Die in der Literatur vorhandenen $[\alpha]_D$ -Werte für Galaktogen bewegen sich für solches aus Eiweißdrüsen bzw. aus Gesamttieren zwischen $-16,1^{06}$ und $17,6^{07}$, für solches aus Eiern zwischen $-23,6^{08}$ und $-16,5^{02}$. Nach den obigen Berechnungen wird man vielleicht für Galaktogen mit $[\alpha]_D$ positiver als -23^0 annehmen dürfen, daß in diesem das D : L-Galaktose-Verhältnis verschoben ist. Der Phosphorgehalt scheint bei Galaktogenen mit verschiedenem $[\alpha]_D$ wenig zu schwanken (vgl. Tab. 3 im Versuchsteil).

Nicht berücksichtigt ist in den vorliegenden Berechnungen der Einfluß, den die eine gebundene Phosphorsäure je 80 Galaktosen auf die Drehung haben kann, doch dürfte er keine grundsätzliche Verschiebung in den $[\alpha]_D$ -Werten bewirken.

Beschreibung der Versuche

Phosphatbestimmungsmethode

Die Phosphorsäure wurde kolorimetrisch als Molybdänblau bestimmt. Wegen der teilweise nur sehr kleinen Mengen an Untersuchungsmaterial wurde die Methode von Hahn⁹ verwendet, die mit Zinn(II)-chlorid als dem empfindlichsten Reduktionsmittel arbeitet und von ihm für 10–150 γ Phosphor ausgearbeitet ist.

Die folgenden Messungen zwischen 10 und 40 γ Phosphor wurden unter Verwendung der 5-cm-Küvette und des Filters S72 direkt mit dieser Methode am Pulfrich-Photometer vorgenommen. Die äußeren Bedingungen für die Farbentwicklung und die Durchführung wurden zur Gewinnung exakt reproduzierbarer Werte etwas abgeändert; z. B. Ersatz der angegebenen Tropfenzahlen der Reagenzien durch Volumabmessungen, Einstellung konstanter Temperatur mit Höppler-Thermostat, Verlängerung der Zeit für die Farbentwicklung von 30 auf 60 Minuten. Die dabei erhaltene Eichkurve zeigt Abb. 1.

Die Methode arbeitet mit einem mittleren Fehler des Mittelwertes von $\pm 3\%$. Im folgenden wird sie als Makromethode bezeichnet, weil daneben eine Mikromethode für 0,5–4 γ , von mir nach dem gleichen Prinzip entwickelt, verwendet wurde. Das Vorgehen zur Veraschung der Substanzen wurde von Hahn übernommen, jede Verbrennung mit genau 0,4 ccm konz. H_2SO_4 durchgeführt und in Leer- und Analysenwert die gleichen Mengen an H_2O_2 zugegeben, die sich jeweils nach dem Anfall an Kohle im Analysenwert richten.

Für die Bestimmung des Phosphorgehaltes vom ungespaltenen Polysaccharid, wo sehr große Mengen organischer Substanz einer sehr kleinen Menge an Phosphor gegenüberstehen, mußte man, um faßbare Mengen an Phosphor zu bekommen, die Polysaccharidmenge in kleinen Portionen in der Schwefelsäure verbrennen.

Jedes Verbrennungsprodukt wurde mit 35 ccm aqua bidest. in ein Erlenmeyerkölbchen übergeführt, 3 Min. gekocht (zur Umwandlung evtl. entstandener Meta- und Pyrophosphorsäure), abgekühlt, mit 1 ccm wäßriger, 0,05-proz. 1-Hydroxy-2,4-Dinitrobenzollösung als Indikator versetzt und dann mit 3-n. Na-Acetat solange titriert, bis der gleiche pH -Wert erreicht war, wie bei einer jeweils im Bedarf frisch

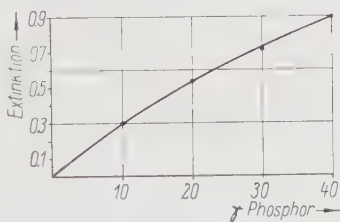


Abb. 1. Eichkurve für 10–40 γ Phosphor.

⁷ H. H. Schlubach u. W. Loop, Liebigs Ann. Chem. 532, 228 [1937].

⁸ F. May, Z. Biol. 92, 325 [1932].

⁹ F. Hahn, Angew. Chem. 60, 207 [1948].

hergestellten Vergleichslösung von 5 ccm 2-n. H_2SO_4 + 30 ccm Wasser + 1 ccm Indikator + 3,3 ccm 3-n. Na-Acetat. Die exakte Durchführung dieser Analysenvorbereitung ist wichtig, da die Farbe der Molybdänblaureaktion äußerst pH-empfindlich ist¹⁰. Danach wurden die Lösungen im 50-ccm-Meßkölbchen zur Marke aufgefüllt (Analyselösung) und mit entsprechenden Entnahmen Makro- und Mikrophosphorbestimmungen durchgeführt.

Mikromethode: Bei Verwendung verschiedener Mengen der Analysenlösung wurde diese im 5-ccm-Meßkölbchen mit aqua bidest. auf 4 ccm ergänzt, dann 100 cmm Molybdatreagens nach Hahn zugegeben und nach guter Durchmischung unter Bewegen des Kölbchens noch 50 cmm 1-proz. $SnCl_2$ -Lösung zugesetzt (hergestellt höchstens 10 Min. vorher aus einer 10-proz. $SnCl_2$ -Lösung in konz. HCl p. a. durch Verdünnen mit aqua bidest.; auch die 10-proz. $SnCl_2$ -Lösung nicht älter als 6 Stdn.). Nach Auffüllen des Kölbchens zur Marke mit aqua bidest. und raschem Umschütteln erfolgt Einhängen in den dunkel stehenden Thermostaten zur Farbentwicklung bei 20,0–20,1° für 60 Minuten.

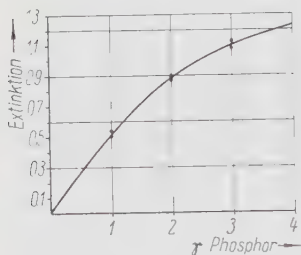


Abb. 2. Eichkurve für 0,5–4 γ Phosphor.

Die Reagenzien werden bei möglichst schwacher Beleuchtung (40 Wattlampe) zugegeben. Der bei jeder Analyse mitgeführte Leerwert wird einschließlich der Molybdatzugabe gemeinsam mit der Analyse vorbereitet; die Zugabe des Reduktionsmittels erfolgt dann regelmäßig zuerst im Leerwert. Die Extinktionsmessung geschieht am Pulfrich-Photometer mit Filter S72 und 5-cm-Mikroküvette. Abb. 2 zeigt die erhaltene Eichkurve. Die Methode arbeitet im ungünstigsten Fall mit einem mittleren Fehler des Mittelwertes von $\pm 5\%$.

Phosphorgehalt des Galaktogens mit $[\alpha]_D = -16,5^\circ$, eines Galaktogens mit $[\alpha]_D = -23^\circ$ und eines Glykogenpräparates, das sich bei Mischung mit jedem der beiden Galaktogene elektrophoretisch von diesen abtrennen läßt¹¹.

Die Substanzen wurden nach Trocknen bei 105° und Aufbewahren über Calciumchlorid direkt in Meßkölbchen eingewogen und zur Marke aufgefüllt. Je 1 ccm wurde in 0,4 ccm konz. H_2SO_4 unter Zugabe exakt abgemessener Mengen von H_2O_2 verbrannt; erst dann wurde ein weiterer ccm zugegeben und wieder abgewartet, bis dieser vollständig verbrannt war. Auf diese Weise konnten bis

Tab. 3. Phosphatbestimmung in Galaktogen und Glykogen.

Substanz	Einwaage mg	aufgefüllt ad ccm	zur Veraschung verwendet insgesamt ccm	entsprechend Substanz mg	aus Veraschungslösung verwendet ccm	Extinktion im Mittel	entspr. Phosphor γ	Gesamtphosphor %
Galaktogen mit $[\alpha]_D = -23^\circ$	55,1	5	4	44,0	1	0,79	1,8	0,20
	55,8	5	4	44,6	1	0,84	1,9	0,21
Galaktogen mit $[\alpha]_D = -16,5^\circ$	53,8	5	2	21,5	1	0,52	1,0	0,23
	53,9	5	4	43,0	1	0,88	2,0	0,23
Glykogen	250,5	25	4	40,1	4	0,61	1,3	0,04
					40*	0,39	13,8	0,04
	256,1	25	4	41,0	4	0,69	1,5	0,046

* Makromethode.

¹⁰ J. Berenblum u. E. Chaim, Biochem. J. **32**, 286 [1938].

¹¹ M. Geldmacher-Mallinckrodt u. H. Weinland, diese Z. **292**, 65 [1953].

zu 4 cem Polysaccharidlösung in einem Kjeldahl-Kölbchen verascht werden. Gleichzeitig wurden entsprechende Leerwerte unter Zugabe genau derselben Menge H_2O_2 mitgeführt. Sämtliche Veraschungsprodukte wurden, wie oben beschrieben, aufgekocht, neutralisiert und in 50-cem-Meßkölbchen mit aqua bidest. zur Marke aufgefüllt (Veraschungslösungen). Bei der Farbentwicklung blieben die Leerwerte völlig farblos.

Die gemessenen Werte in Tab. 3 zeigen, daß der Phosphorgehalt in den beiden Galaktogenen praktisch gleich ist, im Mittel 0,22%. Der Gehalt an Phosphor im Glykogen beträgt nur den fünften Teil davon. Verglichen mit anderen Stärken: Gerstenstärke 0,056%, P. Kartoffelstärke 0,052–0,085%, Maisstärke 0,022% P^{12} , ist der Phosphorgehalt des Glykogens mit diesen etwa gleichwertig. Dagegen ist der Phosphorgehalt der Galaktogene wesentlich höher; hier trifft auf 80–87 Galaktosemoleküle 1 Phosphorsäure.

Wenn man den Phosphorgehalt als Grundlage nehmen darf, wäre die Glykogeneinheit etwa 5mal so groß. Meyer¹³ findet einen aus Organen mit Wasser extrahierbaren Glykogenanteil mit etwa 500 Glucosen pro Molekül.

Für die Abtrennbarkeit des Galaktogens vom Glykogen, über die wir früher berichtet haben^{11,14}, ist offensichtlich der unterschiedliche Phosphorsäuregehalt verantwortlich.

Zusammenfassung

Die gemessene spezif. Drehung des Galaktogens wird theoretisch abgeleitet aus den Drehungsbeiträgen der verschieden gebundenen D- und L-Galaktosen.

Summary

The measured specific rotation of galactogen has been deduced theoretically from the rotations of the variously linked D- and L-galactoses.

¹² K. Myrbäck u. B. Kihlberg, *Biochem. Z.* **315**, 250 [1943].

¹³ K. H. Meyer, G. Noelting u. P. Bernfeld, *Experientia* [Basel] **3**, 370, [1947].

¹⁴ M. Geldmacher-Mallinckrodt u. F. May, *diese Z.* **293**, 256 [1953].

Sonderdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chemie. **306**, Bd. (1956)

Beobachtungen bei der Säurehydrolyse des Galaktogens

V. Mitteil.*): Die säurestabilen Phosphorsäureester (Galaktose-6-phosphorsäure, frei, und als Bestandteil einer Trisaccharid-monophosphorsäure)

Von

H. Weinland

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen
Vorstand: Prof. Dr. Dr. F. May

(Der Schriftleitung zugegangen am 26. Juni 1956)

Die Phosphorsäure des Galaktogens ist noch nach 12 stdg. Hydrolyse in $n/10$ -Schwefelsäure teilweise in Bindung. Bei papierchromatographischer Aufteilung eines Hydrolysenspaltstück-Gemisches kann man eine positive Reaktion nach Hanes und Isherwood¹ auf gebundene Phosphorsäure erhalten; der Phosphor findet sich in den beiden mit Benzidin anfärbbaren Zonen „Frakt. 5 und 6“ der II. Mitteilung, I. c.². Durch Papierelektrophorese lassen sich die phosphathaltigen Spaltstücke von den in der gleichen Zone abgelagerten Tri- bzw. Pentasacchariden trennen. Nach der Eluierung aus den Elektropherogrammen und Einengung im Vakuum erhält man so beide phosphathaltige Fraktionen als sirupartige Lösungen; sie werden im folgenden als „Frakt. 5 negativ“ und „Frakt. 6 negativ“ bezeichnet, „negativ“, weil sie sich nicht weit von der Anode entfernen. Da bei der Elektrophorese in alkalischem Puffer gearbeitet wurde, lagen die Phosphorsäureester neutralisiert vor, p_H der Lösung 6—7. Die freien Phosphorsäureester wurden nicht gesondert dargestellt.

In der folgenden Tabelle sind einige analytische Daten beider Fraktionen angeführt. „Frakt. 5 negativ“ zeigt vor und nach Kochen mit 1- n .HCl die gleiche Reduktionskraft, enthält also keinen glykosidisch gebundenen Rest, der unter diesen Bedingungen abgespalten wäre. Die Phosphorsäureanalyse ergibt, daß auf jede reduzierende Gruppe eine Phosphorsäure trifft. „Frakt. 5 negativ“ ist demnach eine Galaktosemonophosphorsäure mit freier Aldehydgruppe.

„Frakt. 6 negativ“ zeigt nach Kochen mit 1- n .HCl einen Anstieg ihrer Reduktionskraft auf das 2—3-fache. Auch hier ergibt die Phosphorbestimmung auf 1 Aldehydgruppe der nicht invertierten Substanz 1 Phosphorsäuregruppe. Demnach handelt es sich bei dieser Fraktion um eine Trisaccharid-monophosphorsäure mit freier Aldehydgruppe.

*) IV. Mitteil.: F. May u. H. Weinland, diese Z. **305**, 207 [1956].

¹ C. S. Hanes u. F. A. Isherwood, Nature [London] **164**, 1107 [1949].

² H. Weinland, diese Z. **305**, 87 [1956].

Die Tabelle enthält ferner die bei Elektrophorese gefundenen Wanderungsstrecken bei anodennahem Start im Vergleich zur konstanten Ablagerungsstelle der elektroneutralen Galaktose, die mitgewandert war. Der Abstand von der Anode ist für die Trisaccharid-monophosphorsäure, entsprechend ihrem höheren Prozentsatz an elektroneutralen Bestandteilen, größer als bei der Galaktose-monophosphorsäure mit 36% Phosphat, die im Start liegen bleibt.

Die phosphathaltigen Spaltprodukte des Galaktogens nach 12-stdg. Hydrolyse mit $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4^*$.

	Frakt. 5 negativ	Frakt. 6 negativ
Vor Invertierung Konz. (aus Trockengew. minus Asche)	—	2,29%
Galaktose nach Macleod-Robison	0,18%	0,55%
Galaktose nach Hagedorn-Jensen	0,15%	0,53%
Nach Invertierung		
Galaktose nach Macleod-Robison	0,15%	1,38%
Galaktose nach Hagedorn-Jensen	0,14%	1,25%
Phosphor in 0,001 mMol Saccharid	24,6 γ	23,1—25 γ
theoret. Wert für 0,001 mMol P pro 0,001 mMol Saccharid.	31,0 γ	31,0 γ
Im Elektropherogramm zurückgelegter Weg in Richtung nach der Kathode im Vergleich zu Galaktose = 1	0,39	0,0

* Die Werte sind jeweils bezogen auf die Ausgangslösung.

Das Papierchromatogramm nach 3stdg. Hydrolyse der Galaktose-monophosphorsäure mit 1-*n*. HCl zeigt, daß auch bei dieser relativ hohen HCl-Konzentration die Abspaltung der Phosphorsäure nicht quantitativ erfolgt. Ein Teil der Galaktose-monophosphorsäure ist immer noch nachweisbar (vgl. Abb. 1a).

Die Trisaccharid-monophosphorsäure ist nach Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen als solche aus dem Chromatogramm verschwunden, hat aber als neues Spaltstück einen Phosphorsäureester gebildet, der auch säureresistent ist und, nach seinem R_F -Wert = 0,02 zu schließen, identisch ist mit der oben beschriebenen Galaktose-monophosphorsäure (vgl. Abb. 2a).

Die beobachtete Resistenz bei Säurehydrolyse ist charakteristisch für Hexose-6-phosphorsäuren^{3,4}, so daß man die obige Galaktose-monophosphorsäure wahrscheinlich als Galaktose-6-phosphorsäure ansehen darf. Die Ansicht wird gestützt durch das Verhalten des Esters gegenüber einer an D-Galaktose gewöhnten untergärigen Bierhefe, von

³ Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Auflage, Springer-Verlag Berlin 1955, Bd. III, S. 472.

⁴ A. B. Foster, W. G. Overend u. M. Stacey, J. chem. Soc. [London] 1951, 980.

der er nicht vergoren wird (vgl. Abb. 1b u. 2b), und außerdem durch seine positive optische Drehung, die im Laufe der Spaltung ansteigt⁴. Eine genaue spezif. Drehung des Esters anzugeben, ist noch nicht möglich, da die Art des Salzes unbekannt war.

Die bei der Säurehydrolyse von Galaktose-monophosphorsäure teilweise abgespaltene Galaktose wird von an D-Galaktose gewöhnter untergäriger Bierhefe vollständig vergoren (Abb. 1b). Dagegen bleibt bei Vergärung der abgespaltenen Galaktose aus der Trisaccharid-

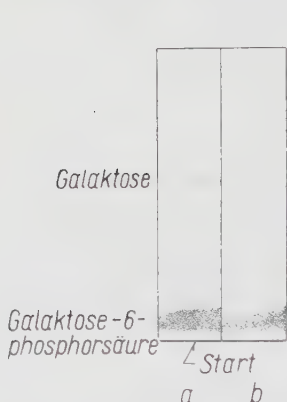


Abb. 1a, b.

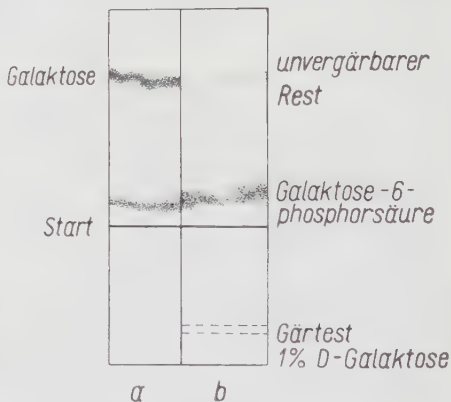


Abb. 2a, b.

Abb. 1. „Frakt. 5 negativ“ nach 3stdg. Spaltung mit 1-n. HCl
a unvergoren, b mit an D-Galaktose gewöhnter untergäriger Bierhefe 3 Stdn. vergoren.

Abb. 2. „Frakt. 6 negativ“ nach 3stdg. Spaltung mit 1-n. HCl
a unvergoren, b mit an D-Galaktose gewöhnter untergäriger Bierhefe 3 Stdn. vergoren.

monophosphorsäure ein einwandfrei unvergärbare Rest, der auf L-Galaktose schließen läßt (in Abb. 2b zwischen den beiden punktierten Linien nur schwer zu erkennen).

Die optische Drehung der Trisaccharid-monophosphorsäure wurde schwach positiv gefunden. Die Berechnung von $[\alpha]_D$ wurde bewußt unterlassen, da die salzbildenden Kationen die Drehung der Zuckerphosphorsäuren beeinflussen⁵.

Abb. 3 zeigt die zeitliche Verfolgung der Säurehydrolyse der Trisaccharid-monophosphorsäure in $n/10$ -HCl. Man erkennt als Zwischenprodukte die beiden früher beschriebenen β -gebundenen Galaktose-disaccharide^{2,6}, durch deren Auftreten die Verzweigung der Trisaccharid-monophosphorsäure erkennbar wird, ferner ein drittes Zwischenprodukt mit R_F 0,02, also abgespaltene Galaktose-6-phosphorsäure, die sich mit

⁵ K. Hinsberg u. K. Lang, Medizinische Chemie, 2. Auflage, Urban & Schwarzenburg, München 1951, S. 53.

⁶ F. May u. H. Weinland, diese Z. 305, 207 [1956].

der Zeit stark ansammelt und schließlich zwei weitere Substanzen, zwischen Start und Galaktose-6-phosphorsäure gelegen, nämlich Galaktose-trisaccharid-monophosphorsäure, die den Start noch berührt und, von ihr nur schwer abgrenzbar, wahrscheinlich Galaktose-disaccharid-monophosphorsäure, die sich ebenfalls anreichert. Die Startstelle selbst ist erst ab der 8. Stde. substanzfrei, d. h. erst dann ist die Trisaccharid-monophosphorsäure, die bei der Hydrolyse als 0,55-proz. Lösung (berechnet auf freie Trisaccharid-monophosphorsäure) vorlag, aus der Hydrolyse verschwunden. Verglichen mit den phosphorfreien Spaltstücken, die unter denselben Bedingungen in 0,032-molaren Lösungen

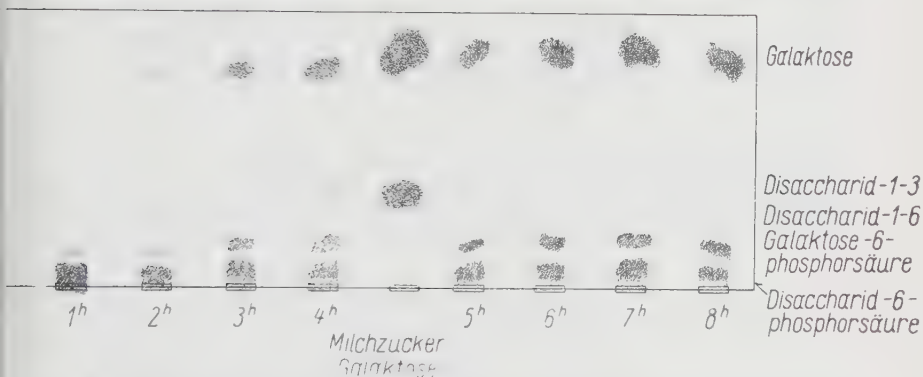
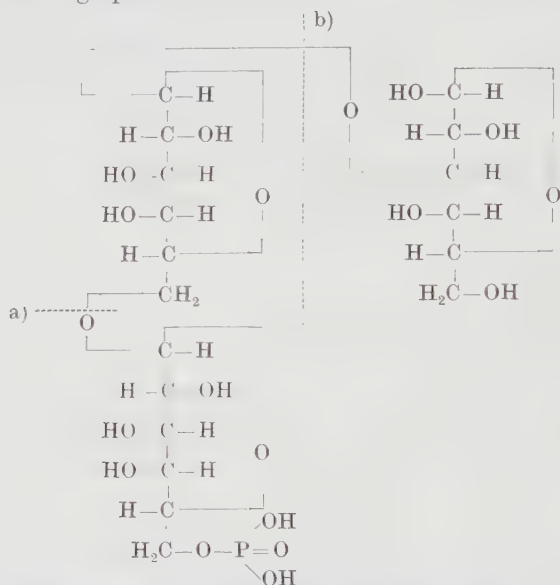


Abb. 3. Hydrolyse der Galaktosetrissaccharid-6-phosphorsäure in $n/10$ -HCl stündlich untersucht. Beginnend links mit 0 Stdn., Auftragungen sauer. Die 6. Startstelle ist für die Testsubstanzen Milchzucker und Galaktose verwendet.

nach 9—10 Stdn. nicht mehr nachweisbar sind⁶, würde die Trisaccharid-monophosphorsäure bei gleicher Molarität erst nach etwa 27 Stdn. verschwunden sein; d. h. die an einer Galaktose an C-6 gebundene Phosphorsäure verlangsamt auch die Abspaltung der Nachbar-Galaktosen wesentlich.

Während der Hydrolyse ist nach Abb. 3 die Konzentration des Disaccharids-1-3 stets größer als die des Disaccharids-1-6. Daraus darf man mit Wahrscheinlichkeit schließen, daß die Phosphorsäure an der Seitenzweig-Galaktose der Trisaccharid-monophosphorsäure verestert ist. Die Säurespaltung führt dann entweder zu Disaccharid-1-3 und Galaktose-6-phosphorsäure, Spaltung a), oder zu Galaktose und zu Disaccharid-1-6-6-phosphorsäure, Spaltung b). Die Entstehung kleiner Mengen Disaccharid-1-6, wahrscheinlich aus Disaccharid-1-6-6-phosphorsäure zeigt an, daß in dieser Verbindung die 6-gebundene Phosphorsäure auch unmittelbar abgespalten werden kann, vor Öffnung der glykosidischen Bindung oder mit anderen Worten, daß hier die Disaccharidbindung fast ebenso säurestabil geworden ist wie die Esterbindung. Nimmt man an, daß die Spaltung a) und b) gleich häufig vorkommen, so kann die Bildung von Disaccharid-1-6 etwa halb so oft erfolgen als die von Disac-

charid-1-3, wenn die beiden Spaltungsmöglichkeiten von Disaccharid-1-6-6-phosphorsäure wegen gleicher Säurestabilität gleich oft gegeben sind. Das Verhältnis bleibt im Hydrolysegemisch erhalten, weil, wie in der III. Mitteil.⁶ gezeigt wurde, beide P-freien Disaccharide in *n*/10-HCl gleich rasch gespalten werden.



Beide aufgefundenen Phosphorsäureester, sowohl Galaktose-6-phosphorsäure als auch Galaktose-trisaccharid-6-phosphorsäure geben mit Mays Kupferlauge⁷ in der Kälte einen unlöslichen blauen Niederschlag, der ebenso wie der von Galaktogen auch beim Erwärmen und Aufkochen der Lösung bestehen bleibt. Die phosphorfreien Galaktogenspaltstücke geben diese Reaktion nicht*.

Durch die vorliegende Arbeit wird das Auftreten von Galaktose-6-phosphorsäure in biologischem Material erstmalig nachgewiesen. Es ist auffällig, daß die Phosphorsäure wie in der Kartoffelstärke⁸ auch im Galaktogen an C₆ gebunden ist. Wie dort hemmt auch hier der 6-Phosphorsäureester den fermentativen Abbau der galaktosidischen Bindungen des Galaktogens, worüber binnen kurzem berichtet wird.

⁷ F. May, Z. Biol. **95**, 277 [1934].

⁸ Th. Posternak, Helv. chim. Acta **18**, 1351 [1935].

* Offensichtlich ist die Entstehung unlöslicher Kupferniederschläge nur möglich, wenn der Phosphorsäuregehalt relativ hoch ist. Der Kupferniederschlag von Glykogen, dessen Phosphorgehalt nur $\frac{1}{5}$ von dem des Galaktogens beträgt, geht beim Erwärmen in Lösung, der von diastatisch angegriffenem Glykogen, in welchem der Phosphorgehalt entsprechend gestiegen ist, ist dagegen wesentlich stabiler. Andere phosphorsäurereiche Polysaccharide, die zum Teil keine unlöslichen Kupferverbindungen liefern, scheinen die Phosphorsäure in polymerer Form oder anderweitig intramolekular abgebunden zu haben.

Beschreibung der Versuche

1. Untersuchung von „Frakt. 5 negativ“

Die farblose trockene Substanz, in etwa 1 ccm Wasser gelöst und zentrifugiert, wird quantitativ in ein 1,5-ccm-Meßkölbchen übergeführt und dieses zur Marke aufgefüllt (Ausgangslösung).

Optische Drehung der Ausgangslösung im 10-cm-Halbmikrorohr: $+0,16^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen).

Die gesamte Ausgangslösung wird im 5-ccm-Meßkölbchen quantitativ gesammelt und zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:3,33).

Diese Lösung wurde verwendet zur:

1. Invertierung,
2. Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison⁹,
3. Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode)¹⁰,
4. Bestimmung des Gesamtphosphors nach Hahn¹¹, modifiziert nach Weinland¹².

ad 1.

2 ccm der 1:3,33 verdünnten Ausgangslösung werden im 1,5-ccm-Meßkölbchen durch Einengen im Vak. bei 10 Torr und Zimmertemperatur gesammelt und zur Trockne eingedampft, dann mit 0,4 ccm 1-n.HCl versetzt und 3 Stdn. im kochenden Wasserbad invertiert, anschließend mit 2-n.NaOH neutralisiert und zur Marke aufgefüllt.

Die invertierte Lösung diente zur:

- a) Bestimmung der optischen Drehung,
- b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison,
- c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen,
- d) Bestimmung des Gesamtphosphors,
- e) Papierchromatographie.

ad a) Optische Drehung der invertierten Lösung im 10-cm-Halbmikrorohr: $+0,25^{\circ} \pm 0,01^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen).

Nun Verdünnung der invertierten Lösung für Analyse b) und c):

Die invertierte Lösung wird quantitativ in einem 5-ccm-Meßkölbchen gesammelt und zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:11,09). Mit dieser Lösung wird die Bestimmung nach Macleod-Robison unmittelbar ausgeführt; für die Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen wird die Lösung weiter verdünnt.

ad b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison:

2 ccm verbrauchen 0,79 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 356 γ Galaktose bzw. 0,0020 mMol Zucker.

ad c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode): 0,5 ccm der oben für Macleod-Robison 1:11,09 verdünnten invertierten Lösung wird im Meßkölbchen ad 5 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1:110,9.

2 ccm verbrauchen 1,85 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 35 γ Galaktose.

1 ccm verbraucht 1,93 $\pm$ 0,01 ccm $n/200$ -Thiosulfat, entspr. 17 γ Galaktose.

Mittel für 1 ccm: 17 $\gamma \pm 0,5 \gamma$ Galaktose.

⁹ M. Macleod u. R. Robison, Biochem. J. **23**, 517 [1929].

¹⁰ P. A. Larsson u. S. L. Sveinsson, Skand. Arch. Physiol. **83**, 58 [1939].
(Eine für Galaktose abgewandelte Hagedorn-Jensen-Methode.)

¹¹ F. Hahn, Angew. Chemie **60**, 207 [1948].

¹² H. Weinland, diese Z. **305**, 219 [1956].

ad d) Bestimmung des Gesamtphosphors: 2 ccm der 1:11,09 verdünnten, invertierten Ausgangslösung werden im Kjeldahl-Kölbchen verascht, mit Wasser aufgenommen, neutralisiert und im 50-ccm-Meßkölbchen zur Marke aufgefüllt (Analyselösung).

Mikromethode: 2 ccm = $0,81 \pm 0,04$ Extinktion, entspr. $1,76 \gamma \text{ P}^*$

Makromethode: 20 ccm = $0,44 \pm 0,002$ Extinktion, entspr. $16,5 \gamma \text{ P}^*$

Mittel für 50 ccm Analysenlösung: $42,5 \gamma \pm 2,5 \gamma$ Phosphor.

* Mittelwerte aus mehreren Analysen.

ad e) Die restliche invertierte Lösung aus 1b) wird nach Einengen zu papierchromatographischen Untersuchungen verwendet.

ad 2.

Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison in der nicht invertierten Lösung: 1 ccm der 1:3,33 verdünnten Ausgangslösung verbraucht 1,19 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 536 γ Galaktose bzw. 0,003 mMol Saccharid.

ad 3.

Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode) in der nicht invertierten Lösung:

0,5 ccm der 1:3,33 verdünnten Ausgangslösung werden in Meßkölbchen ad 5 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1:33,3.

2 ccm verbrauchen 1,61 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 91 γ Galaktose.

1 ccm verbraucht $1,82 \pm 0,015$ ccm $n/200$ -Thiosulfat, entspr. $42 \gamma \pm 3 \gamma$ Galaktose.

Mittel für 1 ccm: $45 \gamma \pm 3 \gamma$ Galaktose.

ad 4.

Bestimmung des Gesamtphosphors: 1 ccm der 1:3,33 verdünnten Ausgangslösung wurde im Kjeldahl-Kölbchen verascht, mit Wasser aufgenommen, aufgeköcht, neutralisiert und im 50-ccm-Meßkölbchen zur Marke aufgefüllt (Analyselösung).

Mikromethode: 2 ccm = $1,14 \pm 0,03$ Extinktion, entspr. $3,2 \gamma \text{ P}^*$

Makromethode: 20 ccm = $0,74 \pm 0,002$ Extinktion, entspr. $31,0 \gamma \text{ P}^*$

Mittel für 50 ccm Analysenlösung = $80 \gamma \pm 2,5 \gamma$ Phosphor.

* Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.

Die Auswertung der Analysen ergibt für die Ausgangslösung die in der Tabelle, S. 57, aufgeführten Konzentrationen. Das Verhältnis von Zucker zu Phosphor ist berechnet aus den Phosphoranalysen 1d) und 4. und den Aldehydgruppenbestimmungen 1b) und 2.

Verhalten der Galaktose-monophosphorsäure gegen Mays Kupferlauge?: Etwa 0,5 mg des Esters wurden im Mikroeagenzglas in 50 cmm aqua bidest. gelöst und mit 1 Tropfen frisch bereiteter filtrierter konzentrierter Kupferlauge versetzt. Es entsteht sofort ein voluminöser blauer Niederschlag, der beim Aufkochen bestehen bleibt. Bei längerem Kochen macht sich die reduzierende Eigenschaft der Substanz durch Abscheidung von Cu-I-Oxyd bemerkbar.

2. Untersuchung von „Frakt. 6 negativ“

Der hellgelbe eingetrocknete Sirup, in etwa 1 ccm Wasser gelöst, wird zentrifugiert, quantitativ in ein 1,5-ccm-Meßkölbchen übergeführt und zur Marke aufgefüllt (Ausgangslösung).

Optische Drehung der Ausgangslösung im 10-cm-Halbmikrorohr: $+0,20^\circ \pm 0,008^\circ$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen).

Die gesamte Ausgangslösung wird quantitativ in ein 10-cm-Meßkölbchen übergeführt und zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:6,67). Diese Lösung wird verwendet:

1. für Invertierungen,
2. für die Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison,
3. nach bestimmten Verdünnungen zu weiteren Analysen,
4. für die Bestimmung des anorganischen und organischen Phosphats.

ad 1.

1. 1 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung wird im Meßkölbchen mit 1,5 ccm Inhalt bei 10 Torr und Zimmertemperatur zur Trockne eingedampft und dann mit 0,5 ccm $n/10\text{-HCl}$ versetzt. Die Lösung dient zur papierchromatographischen Verfolgung der 8stdg. Hydrolyse im kochenden Wasserbad.

2. Je 1 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung werden in 2 Meßkölbchen von 1,5 ccm wie oben eingedampft und dann mit 0,5 ccm $1\text{-}n\text{-HCl}$ versetzt, je 3 Stdn. im kochenden Wasserbad invertiert, anschließend mit $2\text{-}n\text{-NaOH}$ neutralisiert und zur Marke aufgefüllt.

Die invertierte Lösung diene:

- a) für die Bestimmung der optischen Drehung,
- b) für die Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison,
- c) für die Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen,
- d) für Papierchromatographie.

ad a) Optische Drehung der invertierten Lösung im 10-cm-Halbmikrorohr:

Kölbchen 1: $+0,11^{\circ} \pm 0,000^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen)

Kölbchen 2: $+0,11^{\circ} \pm 0,005^{\circ}$ (Mittelwert aus 10 Ablesungen)

Mittel: $+0,11^{\circ} \pm 0,003^{\circ}$

Nun Verdünnung der beiden invertierten Lösungen für Analyse b) und c): Beide Lösungen werden je quantitativ in einem 5-cm-Meßkölbchen gesammelt und zur Marke aufgefüllt (Verdünnung 1:33,3). Mit diesen Lösungen wird die Bestimmung nach Macleod-Robison unmittelbar ausgeführt, für die Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen werden die Lösungen weiter verdünnt.

ad b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison:

Kölbchen 1: 2 ccm verbrauchen 1,82 ccm $n/200\text{-Thiosulfat}$ (Einzelbestimmung), entspr. 819 γ Galaktose bzw. 0,0046 mMol Zucker

Kölbchen 2: 2 ccm verbrauchen 1,87 $n/200\text{-Thiosulfat}$ (Einzelbestimmung), entspr. 842 γ Galaktose bzw. 0,0047 mMol Zucker

Mittel für 2 ccm: $830 \gamma \pm 11 \gamma$ Galaktose bzw. 0,0046 mMol Zucker.

ad c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode): Je 1 ccm der für Macleod-Robison 1:33,3 verdünnten invertierten Lösung wird im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1:333.

Kölbchen 1: 2 ccm verbrauchen $1,67 \pm 0,000$ ccm $n/200\text{-Thiosulfat}$, entspr. 77 γ Galaktose*

1 ccm verbraucht $1,84 \pm 0,005$ ccm $n/200\text{-Thiosulfat}$, entspr. 37 γ Galaktose*

Kölbchen 2: 2 ccm verbrauchen $1,68 \pm 0,01$ ccm $n/200\text{-Thiosulfat}$, entspr. 74 γ Galaktose*

1 ccm verbraucht $1,84 \pm 0,01$ ccm $n/200\text{-Thiosulfat}$, entspr. 37 γ Galaktose*

Mittel für 1 ccm: $37,4 \gamma \pm 0,4 \gamma$ Galaktose.

* Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.

ad d) Die restliche invertierte Lösung aus 2b) wird nach Einengen zu papierchromatographischen Untersuchungen verwendet.

ad 2.

Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison in der nicht invertierten Lösung:

1 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung verbraucht 1,90 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 855 γ Galaktose bzw. 0,0048 mMol Saccharid.

ad 3.

5 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung werden im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt (Verdünnung 1:13,34).

Die Lösung wurde verwendet:

- a) zur Bestimmung von Trockengewicht, Zersetzungstemperatur und Asche,
- b) zur erneuten Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison,
- c) zur Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen.

ada) Trockengewicht und Zersetzungstemperatur: Je 1 ccm der 1:13,34 verdünnten Ausgangslösung werden in 2 gewichtskonstanten Platintiegeln bei 10 Torr und 40° zur Trockne eingedampft (Trockengewicht 2190 γ) und anschließend die Gewichtsabnahme bei steigender Temperatur festgestellt (vgl. Abb. 4).

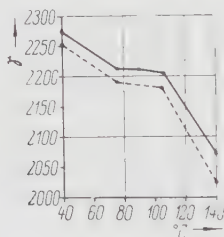


Abb. 4. Trockengewicht und Zersetzungstemperatur der „Frakt. 6 negativ“.

Die Substanz zersetzt sich bei 105°.

Aschegehalt: Nach vorsichtiger Veraschung bei kleiner Flamme blieben 0,470 bzw. 0,468 mg Asche; Mittelwert 0,469 mg Asche in 2,190 mg Substanz = 21,4% Asche.

ad b) Aldehydgruppenbestimmung nach Macleod-Robison in der nicht invertierten Lösung:

1 ccm der 1:13,34 verdünnten Ausgangslösung verbraucht 0,82 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 369 γ Galaktose bzw. 0,0021 mMol Saccharid

2 ccm verbrauchen 1,76 ccm $n/200$ -Thiosulfat (Einzelbestimmung), entspr. 812 γ Galaktose bzw. 0,0044 mMol Saccharid

Mittel für 1 ccm: 394 $\gamma \pm 17 \gamma$ Galaktose.

ad c) Reduktionsbestimmung nach Hagedorn-Jensen (Galaktosemethode) in der nicht invertierten Lösung: 1 ccm der 1:13,34 verdünnten Ausgangslösung wird im Meßkölbchen ad 10 ccm aufgefüllt; nun Verdünnung 1:133,4.

2 ccm verbrauchen 1,66 $\pm$ 0,01 ccm $n/200$ -Thiosulfat, entspr. 79 γ Galaktose*

1 ccm verbraucht 1,82 $\pm$ 0,015 ccm $n/200$ -Thiosulfat, entspr. 41 γ Galaktose*

Mittel für 1 ccm: 40 $\gamma \pm 0,3 \gamma$ Galaktose.

* Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.

ad 4.

Bestimmung von anorganischem und organischem Phosphat:

1. anorganisches Phosphat: 0,5 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung werden im 50-ccm-Meßkölbchen mit 35 ccm neutralisierter Schwefelsäure versetzt und zur Marke aufgefüllt (Analysenlösung).

Mikromethode: 4 ccm = $0,040 \pm 0,03$ Extinktion, entspr. 0,0 γ P

Makromethode: 40 ccm = $0,020 \pm 0,02$ Extinktion, entspr. 0,0 γ P

Mittel für 50 ccm Analysenlösung = 0,0 γ Phosphor.

2. organisch gebundene Phosphorsäure: Zweimal je 1 ccm der 1:6,67 verdünnten Ausgangslösung werden in Kjeldahl-Kölbchen verascht, mit Wasser aufgenommen, aufgeköcht, neutralisiert und je im 50-ccm-Meßkölbchen zur Marke aufgefüllt (Analysenlösung). (Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen.)

Kölbchen 1: Mikromethode: 2 ccm = $0,89 \pm 0,04$ Extinktion, entspr. 2,1 γ P

Makromethode: 20 ccm = $0,56 \pm 0,01$ Extinktion, entspr. 21,4 γ P

Kölbchen 2: Mikromethode: 2 ccm = $0,90 \pm 0,04$ Extinktion, entspr. 2,1 γ P

Makromethode: 20 ccm = $0,55 \pm 0,01$ Extinktion, entspr. 21,0 γ P

Mittel für 50 ccm Analysenlösung = 53 $\gamma \pm 0,2 \gamma$ Phosphor.

Wie die Untersuchung 4₁ zeigt, ist mit Verunreinigung durch anorgan. Phosphat bei dem eingeschlagenen Weg zur Isolierung der Substanzen nicht zu rechnen.

Die Auswertung aller Analysen ergibt für die Ausgangslösung die in der Tabelle S. 57 angegebenen Konzentrationen und das dort eingetragene molare Verhältnis von Phosphor zu Saccharid (berechnet aus den Untersuchungen 2, 3b und 4₂).

Verhalten der Trisaccharid-monophosphorsäure mit Mays Kupferlauge⁷:

Versuch: Etwa 1 mg „Frakt. 6 negativ“ wird im Mikoreagenzglas in 50 cmm aqua bidest. gelöst und mit einem Tropfen frisch bereiteter filtrierter konzentrierter Kupferlauge versetzt. Beim Erwärmen entsteht ein voluminöser, blauer Niederschlag, der auch beim Aufkochen bestehen bleibt. Bei der

Gegenprobe mit dem phosphorsäurefreien Galaktose-pentasaccharid „Frakt. 6 neutral“ bleibt die Lösung völlig klar; auch beim Aufkochen entsteht keine Spur eines Niederschlages.

Zusammenfassung

Es werden zwei Phosphorsäureester in den Spaltstücken des Galaktogens beschrieben, die zufolge ihrer hohen Säurestabilität isoliert werden konnten.

Summary

Two phosphate esters present in the cleavage products of galactogen have been isolated, use being made of their high acid stability.

Sonderdruck aus Hoppe-Seyler's Ztschr. f. physiolog. Chemie. **306**. Bd. (1956)

Hemmung der β -Galaktosidasen durch Galaktose-6-phosphorsäureester in Spaltstücken von Galaktogen

Von

H. Weinland

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen
Vorstand: Prof. Dr. Dr. F. May

(Der Schriftleitung zugegangen am 26. Juni 1956)

Die Wirkung der β -Galaktosidasen konnte bisher an Milchzucker, Allolactose (6- β -D-Galaktosido-D-glucose), Lactobionsäure (4- β -D-Galaktosido-D-gluconsäure) und β -galaktosidisch gebundenen Heterosiden geprüft werden¹. Durch die Gewinnung definierter Galaktogenspaltstücke, die alle β -galaktosidisch gebunden sind, stehen nun Saccharide zur Verfügung, die nur Galaktose enthalten, und zwar sowohl β -1-3- wie β -1-6-gebundenes Disaccharid sowie Tri- und Pentasaccharide mit beiden Bindungen im selben Molekül und ein verzweigtes Trisaccharid mit Phosphorsäure am C₆ der β -1-6-gebundenen Galaktose verestert²⁻⁴. Die genannten Spaltstücke werden im folgenden in ihrem Verhalten gegenüber β -Galaktosidasen untersucht.

Als Fermentpräparate dienten: 1. „Pektinase 2073“ von Röhm & Haas, Darmstadt*, aus *Aspergillus*arten, die schon früher für Fermentuntersuchungen am intakten Galaktogenmolekül verwendet wurde⁵, 2. „Laktase B“ von Rohm & Haas, Philadelphia, aus D-Galaktose vergärenden Hefen gewonnen, (*Saccharomyces fragilis* und *Torula*arten, sowie *Zygosaccharomyces lactis*) und 3. Emulsin aus bitteren Mandeln, Merk, Darmstadt.

Die Mengen an Galaktogenspaltstücken, die für die Untersuchungen zur Verfügung standen, waren für Reagenzglasversuche, bei denen eine Substratkonzentration von etwa 5 ‰ allgemein erwünscht ist⁶, zu klein. Deshalb wurde eine Mikrobebrütungsmethode auf Papier ausgearbeitet, bei welcher 100–500 γ des zu untersuchenden Substrates in der Startlinie des später herzustellenden Chromatogramms aufgetragen werden

* Das Präparat wurde freundlicherweise von der Firma gratis zur Verfügung gestellt.

¹ J. B. Summer u. K. Myrbäck, *The Enzymes*, Academic Press Inc. New York 1950, Bd. 1, S. 623f.

² H. Weinland, diese Z. **305**, 87 [1956].

³ F. May u. H. Weinland, diese Z. **305**, 207 [1956].

⁴ H. Weinland, diese Z. **306**, 56 [1956].

⁵ H. Weinland u. K. Nüchterlein, diese Z. **298**, 48 [1954].

⁶ F. F. Nord u. R. Weidenhagen, *Handbuch der Enzymologie*, Akademische Verlagsgesellschaft Leipzig 1940, S. 538.

als kleiner Strich von der Fläche 15×2 mm. Nach dem Trocknen der aufgetragenen Substratlösung wird nach dem gleichen Verfahren auf dieselbe Stelle mit Blutzuckerpipette zusätzlich die Fermentlösung gebracht und ohne vorheriges Trocknen unmittelbar anschließend die Bebrütung im wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37° durchgeführt. Danach können die an der Luft getrockneten Papiere gleich chromatographiert werden. Kombiniert mit entsprechenden Kontrollchromatogrammen, die alle mitbebrütet wurden, nämlich solchen der

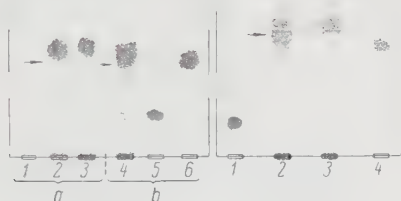


Abb. 1.

Abb. 2.

Abb. 1. Verhalten von 500 γ Galaktogen (a) und von 500 γ 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose (Frakt. 3) (b) bei Fermentierung auf Papier mit „Pektinase 2073“. Chromatogramme: 1. Galaktogen, 2. Galaktogen mit Ferment (Pfeil in Höhe der geringen Menge abgespaltenen Galaktose), 3. Ferment, 4. Fraktion 3 mit Ferment (Pfeil in Höhe der abgespaltenen Galaktose, von Fraktion 3 nichts mehr vorhanden), 5. Fraktion 3, 6. Galaktose.

Abb. 2. Fermentierung von 500 γ 6- β -D-Galaktosido-D-galaktose (Frakt. 4) auf Papier mit „Pektinase 2073“.

Chromatogramme: 1. Frakt. 4, 2. Frakt. 4 mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose.

gleichen Menge Substrat allein, Ferment allein und von Testgalaktose, letztere zur Orientierung auf dem Chromatogramm, ergeben sich mit diesem Mikrobebrütungsverfahren, das hinsichtlich der Konzentrationsverhältnisse sehr günstig eingestellt werden kann, klare Bilder. Eine besondere Pufferung war hier nicht notwendig.

Die β -Galaktosidase in „Pektinase 2073“ spaltet bei diesem Vorgehen die 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose und die 6- β -D-Galaktosido-D-galaktose vollständig (vgl. Abb. 1, Teil b, und Abb. 2). Sie spaltet ferner die phosphorfreie Trisaccharid- und Pentasaccharidfraktion, deren Moleküle an der β -1-3-gebundenen Hauptkette Verzweigungen haben, ebenfalls vollständig zu Galaktose auf (vgl. Abb. 3 und 4). Wahrscheinlich spaltet sie auch noch weit größere Galaktose-oligosaccharide, da auch die nach verschiedenen Hydrolysezeiten bis 12 Stdn. aus dem Start nicht auswandernden phosphorfreien großen Spaltstücke des Galaktogens vollständig gespalten werden.

Die β -Galaktosidase im Präparat „Laktase B“ verhält sich anders. Sie spaltet beide Disaccharide nicht vollständig und offensichtlich die 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose schwerer als die 6- β -D-Galaktose.

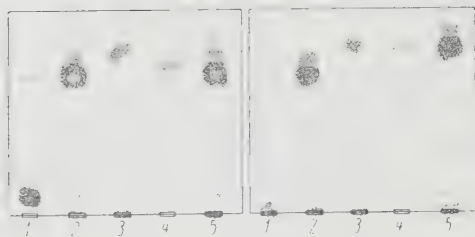


Abb. 3.

Abb. 4.

Abb. 3. Fermentierung von 500 γ Galaktose-trisaccharid („Frakt. 5 neutral“) mit „Pektinase 2073“.

Chromatogramme: 1. Trisaccharid, 2. Trisaccharid mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Trisaccharid mit Ferment.

Abb. 4. Fermentierung von 500 γ Galaktose-pentasaccharid („Frakt. 6 neutral“) mit „Pektinase 2073“.

Chromatogramme: 1. Pentasaccharid, 2. Pentasaccharid mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Pentasaccharid mit Ferment.

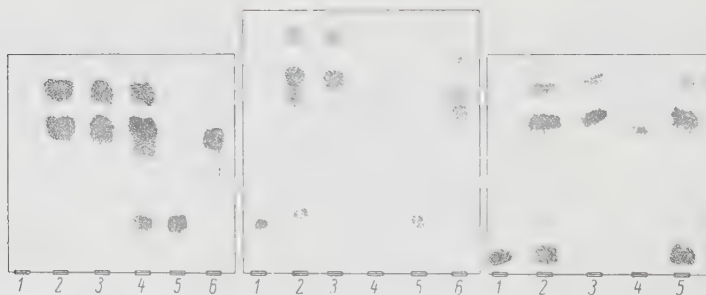


Abb. 5.

Abb. 6.

Abb. 7.

Abb. 5. Verhalten von 500 γ Galaktogen und von 500 γ 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose (Frakt. 3) bei Fermentierung mit „Laktase B“.

Chromatogramme: 1. Galaktogen, 2. Galaktogen mit Ferment, 3. Ferment, 4. Frakt. 3 mit Ferment, 5. Frakt. 3, 6. Galaktose.

Abb. 6. Fermentierung von 500 γ 6- β -D-Galaktosido-D-galaktose (Frakt. 4) mit „Laktase B“.

Chromatogramme: 1. Frakt. 4, 2. Frakt. 4 mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Frakt. 4, 6. Frakt. 4 mit Ferment.

Abb. 7. Fermentierung von 500 γ Galaktose-trisaccharid („Frakt. 5 neutral“) mit „Laktase B“.

Chromatogramme: 1. Trisaccharid, 2. Trisaccharid mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Trisaccharid mit Ferment.

sido-D-galaktose. Daneben aber erfolgen mit diesem Ferment mit beiden Sacchariden Synthesen, die zu teilweise höheren Oligosacchariden führen, und zwar mit 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose reichlicher als mit dem anderen Disaccharid (vgl. Abb. 5 und 6). Des weiteren unterscheidet sich die β -Galaktosidase aus „Laktase B“ von der aus „Pektinase 2073“

dadurch, daß sie phosphorfreies Trisaccharid kaum spaltet (vgl. Abb. 7) und ebenso phosphorfreies Pentasaccharid.

Die β -Galaktosidase aus Emulsin verhält sich gleich wie die aus „Laktase B“. Auch sie spaltet von beiden Disacchariden die 6- β -D-Galaktosido-D-galaktose besser (vgl. Abb. 8 und 9) und synthetisiert

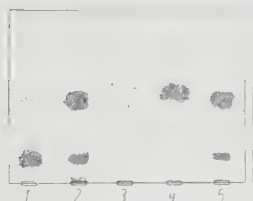


Abb. 8.

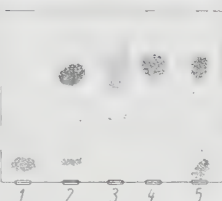


Abb. 9.

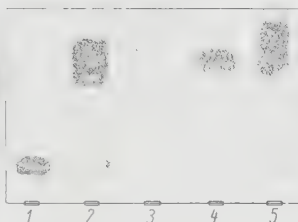


Abb. 11.

Abb. 8. Fermentierung von 500 γ 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose (Frakt. 3) mit Emulsin.

Chromatogramme: 1. Frakt. 3, 2. Frakt. 3 mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Frakt. 3 mit Ferment.

Abb. 9. Fermentierung von 500 γ 6- β -D-Galaktosido-D-galaktose (Frakt. 4) mit Emulsin.

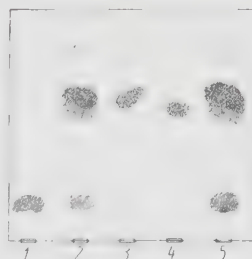
Chromatogramme: 1. Frakt. 4, 2. Frakt. 4 mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Frakt. 4 mit Ferment.

Abb. 11. Fermentierung von 500 γ Milchzucker auf Papier mit Emulsin.

Chromatogramme: 1. Milchzucker, 2. Milchzucker mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Milchzucker mit Ferment.

Abb. 10. Fermentierung von 500 γ Milchzucker mit „Laktase B“.

Chromatogramme: 1. Milchzucker, 2. Milchzucker mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Milchzucker mit Ferment.



mit 3- β -D-Galaktosido-D-galaktose neue Oligosaccharide in höherer Konzentration. Tri- und Pentasaccharid werden auch von ihr nur in Spuren angegriffen. Die β -Galaktosidase aus Emulsin ist also wahrscheinlich mit der aus dem Fermentpräparat „Laktase B“ identisch. Auch Milchzucker wird durch beide Fermentpräparate in demselben Ausmaß gespalten, und zwar etwa gleich gut wie Disaccharid-1-6, wobei Synthesen nur in Spuren erfolgen (vgl. Abb. 10 und 11). Man hat auf Grund dieser Beobachtungen den Eindruck, daß das Ferment bei Transgalaktosidierungen unter verschiedenen Disacchariden als Acceptor eine Auswahl treffen kann.

Ob diese auf Disaccharide eingestellte β -Galaktosidase auch im Fermentpräparat „Pektinase 2073“ enthalten ist, läßt sich noch nicht

entscheiden, weil die dort gleichzeitig vorhandene zweite β -Galaktosidase alle größeren Saccharide und somit auch neu synthetisierte Produkte spaltet.

Verwendet man als Substrat die Trisaccharid-monophosphorsäure, so erreicht man mit keinem der obigen Fermentpräparate einen Abbau. Auch die Trisaccharide gut spaltende β -Galaktosidase aus „Pektinase 2073“ ist unwirksam (vgl. Abb. 12). Offenbar macht die eingebaute Phosphorsäure die Spaltung der beiden verschiedenen β -glykosidischen Bindungen im Trisaccharid unmöglich. Dieser Befund entspricht der Beobachtung von Posternak, daß das Glucose-hexasaccharid aus Kartoffelstärke durch Pankreasamylase nur um eine Maltose verkürzt werden kann, solange die Phosphorsäure nicht auf anderem Weg aus dem Molekül entfernt worden ist⁷.

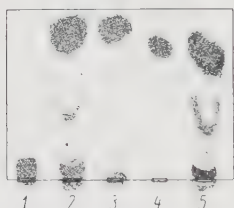


Abb. 12. Fermentierung von 250 γ Galaktosetrisaccharid-6-monophosphorsäure („Frakt. 6 negativ“) auf Papier mit „Pektinase 2073“.

Chromatogramme: 1. Trisaccharid-monophosphorsäure, 2. Trisaccharid-monophosphorsäure mit Ferment, 3. Ferment, 4. Galaktose, 5. Trisaccharid-monophosphorsäure mit Ferment

Diese Befunde lassen sich mit der früher beschriebenen äußerst langsamen Spaltung von Galaktogen durch „Pektinase 2073“⁵ in Einklang bringen, wenn man annimmt, daß die Konfiguration, wie sie in der Trisaccharid-monophosphorsäure vorliegt, den Abschluß des Galaktogenmoleküls am nicht reduzierenden Ende bildet. Die Galaktoseabspaltung durch β -Galaktosidase kann dann, da auch das aldehydische Ende der Saccharide seit langem als allgemein hydrolasenfeindlich erkannt ist⁸, nur durch Wegnahme der Seitengalaktosen erklärt werden, also durch Öffnung der β -1-6-Bindungen und zwar in einem Bereich, der wahrscheinlich möglichst weit von beiden Enden des Moleküls entfernt ist.

Wie das Chromatogramm in Abb. 1, Teil a, zeigt, findet man bei Einwirkung von „Pektinase 2073“ keine Aufspaltung des Galaktogens in benzidinaufärbbare Bruchstücke (die Färbung im Start ist nicht stärker als bei Ferment allein). Offenbar bleibt die Hauptkette des Galaktogens unangegriffen. Als Spaltprodukt ist nur Galaktose, entsprechend dem früher gefundenen Abbau von 2,5—4%^{5,9}, zu sehen.

Da die bisher für die Spaltung von Galaktogen verwendeten Fermentgemische nicht völlig frei von Phosphatasen waren, kann noch nicht festgestellt werden, wie weit der hemmende Einfluß der Phosphorsäure sich entlang der Molekülkette auswirkt.

⁷ Th. Posternak, *Helv. chim. Acta* **18**, 1351 [1935].

⁸ I. c.¹, S. 707.

⁹ H. Weinland, *Biochem. Z.* **324**, 19 [1953].

Durchführung der Fermentierung auf Papier

Für die Auftragungen wurden folgende Konzentrationen gewählt: wo nicht anders vermerkt

- a) Substrat (Galaktogenspaltstück) 5-proz.,
- b) Ferment (d. h. Fermentgemische, nicht geeicht nach einer willkürlich zu schaffenden β -Galaktosidase-Einheit) 5-proz.,
- c) Testgalaktose (zur Ermittlung der Ablagerungsstelle für abgespaltene Galaktose) 1-prozentig.

Alle Lösungen wurden mit aqua bidest. hergestellt, ohne Zugabe von Puffern.

Im allgemeinen wurden folgende Startstellen (abgekürzt Stst.) für eine Untersuchung angelegt, bzw. beschickt:

- Stst. 1: Substrat allein,
- Stst. 2: Substrat zusammen mit Ferment,
- Stst. 3: Ferment allein,
- Stst. 4: Testgalaktose,
- Stst. 5: Substrat zusammen mit Ferment (wie 2, als Doppelversuch).

Nach Auftragung von jeweils 10 cmm Substratlösung in den betreffenden Startstellen wurde bei Zimmertemperatur getrocknet. Dann wurden an den Ststn. für Ferment je 10 cmm Fermentlösung auf Vorder- und Rückseite aller betreffenden Stellen und an den Stellen ohne Ferment entsprechend 10 cmm aqua bidest. aufgetragen. Der Papierbogen wurde noch naß bei 37° in wasserdampfgesättigte Atmosphäre von 37° gebracht und 18 Stdn. bebrütet. Die Bebrütung wurde durch Trocknen des Papiers bei Zimmertemperatur unterbrochen, worauf dieses absteigend in Butanol-Eisessig-Wasser 72 Stdn. chromatographiert und mit Benzidinreagens entwickelt wurde. Jede Untersuchung wurde mehrmals vorgenommen

Zusammenfassung

Es wird eine Mikromethode über Fermentierungen in der Startlinie eines nachträglich zu entwickelnden Papierchromatogrammes beschrieben, die erlaubt, mit 100—500 γ Substrat wenige cmm Fermentlösung auf ihre Spaltfähigkeit für das Substrat zu prüfen.

Mit dieser Methode wird die Wirkung der β -Galaktosidasen bei verschiedenen Spaltstücken des Galaktogens untersucht und gezeigt, daß bei den phosphorfreien eine Spaltung leicht erreicht wird, während bei den phosphorhaltigen die Spaltung nicht möglich ist.

Wahrscheinlich müssen verschiedene β -Galaktosidasen angenommen werden, solche, die Disaccharide und andere, die Oligosaccharide spalten.

Summary

A micro-method is described for effecting enzymatic cleavage in the start line of a paper chromatogram which is subsequently developed. The method enables the splitting capacity of a few cmm of enzyme solution to be tested with 100—500 γ of substrate. The method has been employed to investigate the action of β -galactosidases on various cleavage products of galactogen. It has been found that the phosphorusfree products are readily cleaved while no cleavage takes place with the phosphorus-containing products. It is probable that different β -galactosidases exist, some of which cleave the disaccharides and others, the oligosaccharides.

